

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-000299

(43)Date of publication of application : 07.01.1997

---

(51)Int.Cl. C12Q 1/60  
C12Q 1/26  
C12Q 1/44  
G01N 33/92

---

(21)Application number : 07-154959

(71)Applicant : INTERNATL REAGENTS CORP

(22)Date of filing : 21.06.1995

(72)Inventor : IKEDA MASAOKU  
TABATA MITSUMASA  
SUMIYAMA ISAO  
HASHIGUCHI YOICHI

---

(54) DETERMINATION OF CHOLESTEROL IN LIPOPROTEIN FRACTION HAVING HIGH SPECIFIC GRAVITY AND DETERMINATION REAGENT KIT

## (57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a determination method having simplified operation, enabling the treatment of a number of specimens in a short time and the continuous measurement of even a small amount of specimen by an automatic analyzer and useful for improving the work efficiency in the daily work in clinical examination.

CONSTITUTION: Cholesterol in a lipoprotein fraction other than a high density lipoprotein(HDL) in a specimen is preferentially reacted with an enzyme such as cholesterol esterase or cholesterol oxidase by using an acyl polyoxyethylene sorbitan ester as a surfactant. The produced hydrogen peroxide is discharged from the system by forming a colorless complex in the presence of a peroxidase. The action of the enzymes on cholesterol remaining in a lipoprotein fraction other than HDL is suppressed by an alkyl polyoxyethylene ether as a surfactant and, at the same time, HDL cholesterol is reacted with the enzyme to produce hydrogen peroxide. The quantity of a quinone pigment generated by hydrogen peroxide is determined by colorimetry to quantitatively determine the HDL cholesterol.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

08.03.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

**\* NOTICES \***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The fixed quantity method of the cholesterol in the high-density-lipoprotein fractionation characterized by drawing the resultant which an enzyme is made to act on the cholesterol in lipoprotein fractions other than high density lipoprotein preferentially, and is obtained by surfactant acyl polyoxyethylene sorbitan ester out of the system of reaction, making an enzyme act on the cholesterol in high-density-lipoprotein fractionation next while making the operation by the enzyme to the cholesterol with which it remains in lipoprotein fractions other than high density lipoprotein suppress with the surfactant alkyl polyoxyethylene ether, and advancing a reaction.

[Claim 2] The way according to claim 1 enzymes are cholesterol esterase and cholesterol oxidase.

[Claim 3] The reagent kit for cholesterol fixed quantities in the high-density-lipoprotein fractionation characterized by the bird clapper from the 1st reagent containing surfactant acyl polyoxyethylene sorbitan ester and an enzyme, and the 2nd reagent containing the surfactant alkyl polyoxyethylene ether.

[Claim 4] The reagent kit according to claim 3 whose enzymes are cholesterol esterase and cholesterol oxidase.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

## [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] this invention especially relates to the fixed quantity method of the HDL cholesterol in biological materials, such as a blood serum, and the reagent kit for HDL cholesterol fixed quantities in the field of a clinical test about the fixed quantity method of the cholesterol (henceforth "HDL cholesterol") in high-density-lipoprotein (HDL) fractionation, and the reagent kit for fixed quantities.

[0002]

[Description of the Prior Art] The lipoprotein in blood was classified into a Cairo micron (specific gravity <1.006), very low density lipoprotein (VLDL, specific gravity 1.006-1.019), low-density lipoprotein (LDL, specific gravity 1.019-1.063), high density lipoprotein (HDL, specific gravity 1.063-1.21), etc. according to the specific gravity, and research on a disease which affects the metabolism of these lipoprotein has been advanced. Research is progressing quickly since the report of Framingham in 1977 that the cholesterol which is a component in the fractionation is closely related to ischemic heart disease about HDL especially.

[0003] the fixed quantity of the former and HDL cholesterol — a precipitated part — the cholesterol which is the component is measured by the well-known method about the HDL fractionation separated by the drawing technique, the ultracentrifugal method, the electrophoresis method, etc. measurement by the clinical test — a precipitated part — the drawing technique is often performed This settles lipoprotein fractions other than HDL using a precipitant, carries out centrifugal separation of it, and obtains HDL fractionation. As a precipitant at this time, the combination of the poly anion and a divalent cation is used well. There are a polyethylene glycol, a tungstophosphoric acid, dextran sulfate, etc. in such a poly anion, and Mg, Mn, calcium, Li, nickel, etc. are known as a divalent cation.

[0004] Next, as a well-known method of carrying out the fixed quantity of the cholesterol in the HDL fractionation obtained by centrifugal separation, measurement by the enzyme reaction is used well. The method of measuring an absorbance in a visible-region field especially combining a peroxidase (POD) and a chromogen using cholesterol esterase (CE) and cholesterol oxidase (CO) further is learned well.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, by the method using such a conventional precipitant, when the automatic analyzer for increase in efficiency was used by the routine work of a clinical test since operation of centrifugal separation is needed in order to have separated HDL fractionation, there were restrictions that direct use could not be carried out. Therefore, there was trouble in multichannel-izing HDL cholesterol with other inspection items, and measuring.

[0006] this invention solves an above-mentioned technical problem, and aims at offering the useful method of especially measuring using an automatic analyzer in a clinical test for the purpose of measuring HDL cholesterol efficiently, and the reagent kit for it.

[0007]

[Means for Solving the Problem] This invention persons found out that the cholesterol in HDL fractionation could be measured by using the surfactant which makes the operation by the enzyme to the surfactant which makes an enzyme act on the cholesterol in lipoprotein

fractions other than HDL preferentially, and the KORESURE roll in lipoprotein fractions other than HDL suppress, as a result of inquiring wholeheartedly. And as a result of repeating research further, it finds out that the above-mentioned purpose is attained and came to complete this invention.

[0008] That is, this invention draws the resultant which an enzyme is made to act on the cholesterol in lipoprotein fractions other than HDL preferentially, and is obtained by surfactant acyl polyoxyethylene sorbitan ester out of the system of reaction, and relates to the fixed quantity method of the HDL cholesterol characterized by making an enzyme act on HDL cholesterol and next advancing a reaction with the surfactant alkyl polyoxyethylene ether while making the operation by the enzyme to the cholesterol with which it remains in lipoprotein fractions other than HDL suppress.

[0009] Moreover, this invention relates to the reagent kit for HDL cholesterol fixed quantities characterized by the bird clapper from the 1st reagent containing surfactant acyl polyoxyethylene sorbitan ester and an enzyme, and the 2nd reagent containing the surfactant alkyl polyoxyethylene ether.

[0010] As an enzyme in the reagent kit of this invention which acts on cholesterol, cholesterol esterase (CE), cholesterol oxidase (CO), etc. are illustrated. Since the cholesterol ester is also contained besides cholesterol, in order to make a cholesterol ester understand an added water part and to make it usually change into cholesterol, cholesterol esterase (CE) is made to coexist with cholesterol oxidase (CO) in a lipoprotein fraction.

[0011] the enzyme in the 1st reagent in the reagent kit of this invention — the case of CE — one unit / ml — 100 unit / ml — desirable — the case of one unit / ml — 50 unit / ml and CO — 0.5 units / ml — 100 unit / ml — although it blends so that it may be preferably set to one unit / ml — 50 unit / ml, according to the kind of sample etc., it is determined suitably

[0012] The surfactant acyl polyoxyethylene sorbitan ester on which the above-mentioned enzyme is made to act preferentially is usually Cn to the cholesterol contained in LDL and VLDL which are lipoprotein fractions other than HDL, a Cairo micron, etc. Sorbitan Ex It is the nonionic surfactant which is outlined and which has a polyoxyethylene in a hydrophilic portion, and all can be used if the purpose of this invention is suited. As a concrete tradename, Tween 21 (C12 sorbitan E4), Tween 81 (C12 sorbitan E5) and Tween 20 (C12 sorbitan E20), Tween 40 (C16 sorbitan E20) and Tween 60 (C18 sorbitan E20), Tween80 (C18:1 sorbitan E20), Emasol4130 (C18 sorbitan Ex), Tween85 (C17:1 sorbitan E20), etc. are illustrated.

[0013] the surfactant acyl polyoxyethylene sorbitan ester in the 1st reagent in the reagent kit of this invention — usually — the inside of reaction mixture — setting — 0.001 w/v% — 0.1 — although it is blended w/v% so that it may become 0.001 w/v% — 0.05 w/v% preferably, according to the kind of sample etc., it is determined suitably

[0014] The surfactant alkyl polyoxyethylene ether which makes the operation of the above-mentioned enzyme to the cholesterol in lipoprotein fractions other than HDL suppress is usually Cn Ex. It is the nonionic surfactant which is outlined and which has a polyoxyethylene in a hydrophilic portion, and all can be used if the purpose of this invention is suited. As a concrete tradename, Atlas G2127 (C12E8), Brij36T (C12E10), Nopalcal6-L (C12E14), Brij35 (C12E23), Emulogphene BC720 (C12E9.8), SteroxAJ100 (C13E9.5), Brij56 (C16E10), Brij58 (C16E20), Brij76 (C18E10), Brij96 (C18:1E10), Brij78 (C18E20), Brij98 (C18:1E29), etc. are illustrated.

[0015] the surfactant alkyl polyoxyethylene ether in the 2nd reagent in the reagent kit of this invention — usually — the inside of reaction mixture — setting — 0.001 w/v% — 5w/v% — desirable — 0.05 w/v% — 2w/v% — becoming — the [ moreover, ] — although it is blended so that it may become high concentration from the surfactant acyl polyoxyethylene sorbitan ester blended into 1 reagent, according to the kind of sample etc., it is determined suitably

[0016] By the fixed quantity method of this invention, the enzyme which acts on cholesterol first, the above-mentioned surfactant acyl polyoxyethylene sorbitan ester, and a sample are mixed. Then, the enzyme contained in reaction mixture acts with the priority to the cholesterol in lipoprotein fractions other than HDL by existence of surfactant acyl polyoxyethylene sorbitan ester.

[0017] When an enzyme consists of combination of CE and CO, a hydrogen peroxide generates as a resultant of cholesterol by operation of an enzyme. In the fixed quantity method of this invention, before making the surfactant alkyl polyoxyethylene ether in the 2nd reagent intermingled in the system of reaction, it is necessary to draw the generated resultant out of the system of reaction for example, and a chromogen is used. A chromogen is an organic compound which does not contain auxochromes, such as a hydroxyl group and an amino group, including chromophores, such as a nitro group, an azo machine, a carbonyl group, an ethylenic linkage, and a cyano basis. Although coloring capacity is weak as a chromogen which may be used in this invention if independent, when the organic compound containing the above-mentioned auxochrome lives together, that by which coloring capacity is reinforced is desirable. When a resultant is a hydrogen peroxide, they are N-(2-hydroxy-3-sulfo propyl)-3, 5-dimethoxy aniline sodium salt (HDAOS), and N-ethyl under existence of a peroxidase (POD). -(2-hydroxy-3-sulfo propyl)- A chromogen and hydrogen peroxides, such as meta toluidine (TOOS), can be made to be able to react, colorless complex can be made to be able to form, and a hydrogen peroxide can be led out of the system of reaction.

[0018] usually, POD — 0.01U/ml-10U/ml — desirable — the concentration of 0.5U/ml-5U/ml and a chromogen — 0.001 w/v%-1 — w/v%, although preferably considered as 0.01 w/v% - 0.5 w/v%, according to the kind of sample etc., it is determined suitably

[0019] Next, while an operation of an enzyme is suppressed in reaction mixture to the cholesterol with which it remains in lipoprotein fractions other than HDL by making the surfactant alkyl polyoxyethylene ether in the 2nd reagent intermingled, an enzyme acts to HDL cholesterol and the reaction of cholesterol advances by operation of an enzyme.

[0020] A hydrogen peroxide is generated by this reaction when an enzyme consists of combination of CE and CO. This hydrogen peroxide carries out the condensation reaction of the organic compound (0.001 w/v% - 0.1 w/v%, preferably 0.001 w/v% - 0.05 w/v%) containing auxochromes, such as for example, a 4-amino antipyrin, and the chromogen, and makes quinone coloring matter generate under existence of POD. In addition, above-mentioned HDAOS, TOOS, etc. can be mentioned as a chromogen. HDL cholesterol can be measured by carrying out colorimetric measurement of this quinone coloring matter. Colorimetric measurement can be performed by the known method, for example, can be performed using an automatic analyzer.

[0021] Although each reaction before making each reaction in this invention method, i.e., the 2nd reagent, intermingled in the system of reaction, or after making it intermingled is usually preferably performed for [ for / 3 minutes / - ] 7 minutes for [ for / 1 minute / - ] 10 minutes under a room temperature, respectively, it is not limited to especially this condition.

[0022] The reagent kit for HDL cholesterol fixed quantities of this invention consists of the 1st reagent containing above-mentioned surfactant acyl polyoxyethylene sorbitan ester and an above-mentioned enzyme, and the 2nd reagent containing the surfactant alkyl polyoxyethylene ether.

[0023] CE, CO, etc. can be mentioned to the enzyme in the 1st reagent. Into the 1st reagent, other than an enzyme, usually, although chromogens, such as HDAOS and TOOS, may be blended further, Enzyme POD and the thing which reacts with these chromogens and generates quinone coloring matter, for example, a 4-amino antipyrin etc., are not blended again, for example.

[0024] On the other hand, into the 2nd reagent, what generates quinone coloring matter [ other than the surfactant concerned ] with a chromogen, for example, a 4-amino antipyrin etc., is usually blended.

[0025] In addition, the reagent kit of this invention should just be divided into two kinds of reagents, the 1st and the 2nd, in this way at the latest at the time of fixed quantity measurement of HDL cholesterol. It seems that therefore, the form as a reagent kit is divided into three or more kinds of reagents in consideration of stability etc., and may generally be prepared into two kinds of reagents, the above 1st and the 2nd, at the time of use for measurement.

[0026]

[Example] Although an example is hereafter given in order to explain this invention to a detail more, this invention is not limited to these.

[0027] [Example 1] As surfactant acyl polyoxyethylene sorbitan ester, as Tween85 and the surfactant alkyl polyoxyethylene ether, the tradename used the surfactant of Brij98, respectively and the tradenam prepared the 1st and 2nd following reagents.

[0028] The <1st reagent> The phosphate buffer solution (pH 7.0) of 10mM, 0.12mg [/ml ] HDAOS, 0.6 units / POD of ml, ten units / CO of ml, ten units / CE of ml, and 0.01 w/v% of Tween85. [0029] The <2nd reagent> The phosphate buffer solution (pH 7.0) of 10mM, a 0.15mg [/ml ] 4-amino antipyrin, and 1.5 w/v% of Brij98. [0030] Using the Hitachi 7170 type automatic analyzer, the 250micro of the 1st reagent I was added to 4micro of samples I, the 50micro of the 2nd reagent I was added after 5 minutes, and it measured by the wavelength of 600nm / 700nm after 5 minutes. When that with which HDL cholesterol concentration diluted the blood serum of 150 mg/dl in ten stages as a sample was used, good linearity was acquired as shown in Table 1.

[0031]

[Table 1]

希釈率	測定濃度 (mg/dl)
0	0
1/10	13.3
2/10	26.6
3/10	39.7
4/10	52.5
5/10	68.0
6/10	83.0
7/10	100.0
8/10	116.7
9/10	134.1
10/10	150

[0032] In this example, after adding the 1st reagent, complicated operation of centrifugal separation etc. is not needed, but the 2nd reagent is only added in a sample, and colorimetric measurement of the quinone coloring matter generated corresponding to the amount of the HDL cholesterol in a sample is performed.

[0033] [Example 2] Using the same reagent as an example 1, the man blood serum of 20 examples was similarly measured as a sample with the Hitachi 7170 type automatic analyzer, and the HDL cholesterol value was calculated from measurement of the standard solution. and — the same sample — commercial product [tradename: — it compared with the value measured using] by HDL-(KORESUG) International Reagents Corp. Consequently, good functionality was obtained as shown in Table 2.

[0034]

[Table 2]

試料No	本発明の方法	従来の方法 (市販製品)
1	57.3	55.8
2	55.6	58.6
3	28.5	21.0
4	75.4	74.4
5	55.1	50.8
6	69.0	65.5
7	67.0	61.5
8	37.3	33.2
9	43.8	40.1
10	77.8	78.4
11	65.6	56.7
12	83.5	82.0
13	54.4	52.1
14	49.4	47.5
15	57.9	55.5
16	48.3	44.0
17	56.1	55.1

18	52.9	49.7
19	60.3	52.9
20	127.4	124.5

単位: mg/dl

[0035]

[Effect of the Invention] according to the fixed quantity method of the HDL cholesterol of this invention — a part for the former and precipitation — since operation of the centrifugal separation needed in the drawing technique becomes unnecessary, operation is simplified, it is a short time and many samples can be processed easily And since it is applicable to the method using two kinds of reagents, the continuous measurement using the general-purpose type automatic analyzer is attained, and HDL cholesterol can be multichannel-ized with other inspection items, and can be measured. Moreover, since an opportunity to touch a sample with a direct hand decreases remarkably when dealing with a sample, the danger of virus infection also decreases. Furthermore, measurement becomes possible, even when the amounts of blood collecting, such as a child and an old man, have a limit also to the sample of a minute amount, since it is measurable. Therefore, this invention method is very useful in the field of a clinical test, and it can contribute to improvement in the working efficiency in the routine work of a clinical test.

[0036] Moreover, the reagent kit for HDL cholesterol fixed quantities of this invention does so the effect as a reagent kit for enforcing this invention method.

---

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-299

(43)公開日 平成9年(1997)1月7日

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/60		7823-4B	C 1 2 Q 1/60	
	1/26	7823-4B	1/26	
	1/44	7823-4B	1/44	
G 0 1 N 33/92			G 0 1 N 33/92	A

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 5 頁)

(21)出願番号	特願平7-154959	(71)出願人	000170565 国際試薬株式会社 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号
(22)出願日	平成7年(1995)6月21日	(72)発明者	池田 昌郁 神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内
		(72)発明者	田畑 光正 神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内
		(72)発明者	角山 功 神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内
		(74)代理人	弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高比重リポ蛋白分画中のコレステロールの定量方法及び定量用試薬キット

## (57)【要約】

【構成】 界面活性剤アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルにより、試料中の高比重リポ蛋白 (HDL) 以外のリポ蛋白分画中のコレステロールにコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼなどの酵素を優先的に作用させて、過酸化水素を生成させる。ペルオキシダーゼの存在下で無色の複合体を形成させて、過酸化水素を反応系外に導く。次に、界面活性剤アルキルポリオキシエチレンエーテルにより、HDL 以外のリポ蛋白分画中の残存するコレステロールに対するこれら酵素の作用を抑制させるとともに、HDL コレステロールに酵素を作用させて、過酸化水素を生成させる。過酸化水素により生成されたキノン色素を比色測定して、HDL コレステロールを定量する。

【効果】 操作が簡略化され、多数の試料を短時間で処理できる。微量の試料でも自動分析装置にて連続的に測定できる。臨床検査の日常業務における作業効率の向上に貢献できる。



1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 界面活性剤アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルにより、高比重リポ蛋白以外のリポ蛋白分画中のコレステロールに酵素を優先的に作用させて得られる反応生成物を反応系外に導き、次に界面活性剤アルキルポリオキシエチレンエーテルにより、高比重リポ蛋白以外のリポ蛋白分画中の残存するコレステロールに対する酵素による作用を抑制させるとともに、高比重リポ蛋白分画中のコレステロールに酵素を作用させて反応を進行させることを特徴とする高比重リポ蛋白分画中のコレステロールの定量方法。

【請求項2】 酵素がコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼである請求項1記載の方法。

【請求項3】 界面活性剤アシルポリオキシエチレンソルビタンエステル及び酵素を含む第1試薬と、界面活性剤アルキルポリオキシエチレンエーテルを含む第2試薬とからなることを特徴とする高比重リポ蛋白分画中のコレステロール定量用試薬キット。

【請求項4】 酵素がコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼである請求項3記載の試薬キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、高比重リポ蛋白（HDL）分画中のコレステロール（以下「HDLコレステロール」ともいう。）の定量方法及び定量用試薬キットに関し、とりわけ臨床検査の分野において、血清などの生体試料中のHDLコレステロールの定量方法、及びHDLコレステロール定量用試薬キットに関する。

## 【0002】

【従来の技術】血液中のリポ蛋白はその比重により、カイロミクロン（比重<1.006）、超低比重リポ蛋白（VLDL、比重1.006~1.019）、低比重リポ蛋白（LDL、比重1.019~1.063）、高比重リポ蛋白（HDL、比重1.063~1.21）などに分類され、これらのリポ蛋白の代謝に影響を与える疾患についての研究が進められてきた。中でもHDLについては、その分画中の成分であるコレステロールが虚血性心疾患に密接に関係するとの1977年のFraminghamの報告以来、急速に研究が進んでいる。

【0003】従来、HDLコレステロールの定量は沈殿分画法、超遠心法、電気泳動法などにより分離されたHDL分画について、その成分であるコレステロールが公知の方法にて測定されている。臨床検査での測定では、沈殿分画法がよく行われている。これは沈殿剤を用いてHDL以外のリポ蛋白分画を沈殿させ、それを遠心分離してHDL分画を得る。このときの沈殿剤としては、ポリアニオンと2価のカチオンとの組み合わせが良く用いられる。このようなポリアニオンにはポリエチレングリ

2

コール、リンタングステン酸、デキストラン硫酸などがあり、また2価のカチオンとしてはMg、Mn、Ca、Li、Niなどが知られている。

【0004】次に、遠心分離により得られたHDL分画中のコレステロールを定量する公知の方法としては、酵素反応による測定が良く用いられる。なかでも、コレステロールエステラーゼ（CE）とコレステロールオキシダーゼ（CO）を用い、さらにペルオキシダーゼ（POD）と色原体とを組み合わせで可視部領域で吸光度を測定する方法が良く知られている。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、このような従来の沈殿剤を用いる方法で、HDL分画を分離するには、遠心分離の操作が必要となるため、臨床検査の日常業務で効率化のための自動分析装置を用いる場合には、直接利用できないという制約があった。そのためHDLコレステロールを他の検査項目とマルチチャンネル化して測定するには支障があった。

【0006】本発明は、上述の課題を解決し、HDLコレステロールを効率良く測定することを目的とし、とりわけ臨床検査において自動分析装置を用いて測定できる有用な方法及びそのための試薬キットを提供することを目的とする。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究した結果、HDL以外のリポ蛋白分画中のコレステロールに酵素を優先的に作用させる界面活性剤と、HDL以外のリポ蛋白分画中のコレステロールに対する酵素による作用を抑制させる界面活性剤とを用いることにより、HDL分画中のコレステロールが測定できることを見出した。そして、さらに研究を重ねた結果、上述の目的が達成されることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち、本発明は、界面活性剤アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルにより、HDL以外のリポ蛋白分画中のコレステロールに酵素を優先的に作用させて得られる反応生成物を反応系外に導き、次に界面活性剤アルキルポリオキシエチレンエーテルにより、HDL以外のリポ蛋白分画中の残存するコレステロールに対する酵素による作用を抑制させるとともに、HDLコレステロールに酵素を作用させて反応を進行させることを特徴とするHDLコレステロールの定量方法に関するものである。

【0009】また、本発明は、界面活性剤アシルポリオキシエチレンソルビタンエステル及び酵素を含む第1試薬と、界面活性剤アルキルポリオキシエチレンエーテルを含む第2試薬とからなることを特徴とするHDLコレステロール定量用試薬キットに関するものである。

【0010】本発明の試薬キットにおける、コレステロールに作用する酵素としては、コレステロールエステラ

3

ーゼ (CE)、コレステロールオキシダーゼ (CO) などが例示される。リポ蛋白分画中には、コレステロールの他にコレステロールエステルも含まれているので、通常、コレステロールエステルを加水分解させてコレステロールに変換させるために、コレステロールエステラーゼ (CE) をコレステロールオキシダーゼ (CO) と共存させる。

【0011】本発明の試薬キットにおける第1試薬中の酵素は、例えばCEの場合には、1単位/ml~100単位/ml、好ましくは1単位/ml~50単位/ml、COの場合には、0.5単位/ml~100単位/ml、好ましくは1単位/ml~50単位/mlとなるように配合するが、試料の種類などに応じて適宜決定される。

【0012】HDL以外のリポ蛋白分画であるLDL、VLDL、カイロミクロンなどに含まれるコレステロールに対して、上記酵素を優先的に作用させる界面活性剤アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルは、通常  $C_n$  ソルビタンE<sub>x</sub> と略記される、親水性部分にポリオキシエチレンを持つ非イオン性界面活性剤であり、本発明の目的に適合するものであれば全て用いることができる。具体的な商品名としては、Tween 21 (C<sub>12</sub>ソルビタンE<sub>4</sub>)、Tween 81 (C<sub>12</sub>ソルビタンE<sub>5</sub>)、Tween 20 (C<sub>12</sub>ソルビタンE<sub>20</sub>)、Tween 40 (C<sub>16</sub>ソルビタンE<sub>20</sub>)、Tween 60 (C<sub>18</sub>ソルビタンE<sub>20</sub>)、Tween 80 (C<sub>18:1</sub>ソルビタンE<sub>20</sub>)、Emasol 4130 (C<sub>18</sub>ソルビタンE<sub>x</sub>)、Tween 85 (C<sub>17:1</sub>ソルビタンE<sub>20</sub>) などが例示される。

【0013】本発明の試薬キットにおける第1試薬中の界面活性剤アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルは、通常、反応液中において0.001w/v%~0.1w/v%、好ましくは0.001w/v%~0.05w/v%となるように配合されるが、試料の種類などに応じて適宜決定される。

【0014】HDL以外のリポ蛋白分画中のコレステロールに対する上記酵素の作用を抑制させる界面活性剤アルキルポリオキシエチレンエーテルは、通常  $C_n$  E<sub>x</sub> と略記される、親水性部分にポリオキシエチレンを持つ非イオン性界面活性剤であり、本発明の目的に適合するものであれば全て用いることができる。具体的な商品名としては、Atlas G 2127 (C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>)、Brij 36 T (C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>)、Nopalcal 6-L (C<sub>12</sub>E<sub>14</sub>)、Brij 35 (C<sub>12</sub>E<sub>23</sub>)、Emulogphene BC 720 (C<sub>12</sub>E<sub>9.8</sub>)、Sterox A J 100 (C<sub>13</sub>E<sub>9.5</sub>)、Brij 56 (C<sub>16</sub>E<sub>10</sub>)、Brij 58 (C<sub>16</sub>E<sub>20</sub>)、Brij 76 (C<sub>18</sub>E<sub>10</sub>)、Brij 96 (C<sub>18:1</sub>E<sub>10</sub>)、Brij 78 (C<sub>18</sub>E<sub>20</sub>)、Brij 98 (C<sub>18:1</sub>E<sub>29</sub>) などが例示される。

【0015】本発明の試薬キットにおける第2試薬中の界面活性剤アルキルポリオキシエチレンエーテルは、通常、反応液中において0.001w/v%~5w/v

4

%、好ましくは0.05w/v%~2w/v%となり、また第1試薬中に配合される界面活性剤アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルよりも高濃度となるように配合されるが、試料の種類などに応じて適宜決定される。

【0016】本発明の定量方法では、まずコレステロールに作用する酵素と、上記界面活性剤アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルと、試料とを混合させる。すると、界面活性剤アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルの存在により、反応液中に含まれる酵素が、HDL以外のリポ蛋白分画中のコレステロールに優先的に作用する。

【0017】酵素がCEとCOとの組合せからなる場合には、酵素の作用によりコレステロールの反応生成物として過酸化水素が生成する。本発明の定量方法においては、第2試薬中の界面活性剤アルキルポリオキシエチレンエーテルを反応系に混在させる前に、生成した反応生成物を反応系外に導く必要があり、例えば色原体が用いられる。色原体は、ニトロ基、アゾ基、カルボニル基、エチレン結合、シアン基などの発色団を含み、水酸基、アミノ基などの助色団を含まない有機化合物である。本発明において用いられ得る色原体としては、単独では発色能力が弱い、上記助色団を含む有機化合物が共存することにより、発色能力が増強されるものが好ましい。反応生成物が過酸化水素である場合には、ペルオキシダーゼ (POD) の存在下で、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリンナトリウム塩 (HDAOS)、N-エチル- (2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン (TOOS) などの色原体と過酸化水素とを反応させて、無色の複合体を形成させ、過酸化水素を反応系外に導くことができる。

【0018】通常、PODは、0.01U/ml~10U/ml、好ましくは0.5U/ml~5U/ml、色原体の濃度は、0.001w/v%~1w/v%、好ましくは0.01w/v%~0.5w/v%とするが、試料の種類などに応じて適宜決定される。

【0019】次に、反応液中に、第2試薬中の界面活性剤アルキルポリオキシエチレンエーテルを混在させることによって、HDL以外のリポ蛋白分画中の残存するコレステロールに対して、酵素の作用が抑制されるとともに、酵素がHDLコレステロールに対して作用し、酵素の作用によりコレステロールの反応が進行する。

【0020】酵素がCEとCOとの組合せからなる場合には、この反応により過酸化水素が生成される。この過酸化水素は、PODの存在下で、例えば4-アミノアンチピリンなどの助色団を含む有機化合物 (0.001w/v%~0.1w/v%、好ましくは0.001w/v%~0.05w/v%) と、色原体とを縮合反応させ、キノン色素を生成させる。なお、色原体としては、上述

5

のHDAOS、TOOSなどを挙げるができる。このキノン色素を比色測定することによって、HDLコレステロールが測定できる。比色測定は既知の方法により行うことができ、例えば自動分析装置を用いて行うことができる。

【0021】本発明方法における各反応、即ち第2試薬を反応系に混在させる前または混在させた後の各反応は、それぞれ通常、室温下で、1分間～10分間、好ましくは3分間～7分間行なわれるが、特にこの条件に限定されるものではない。

【0022】本発明のHDLコレステロール定量用試薬キットは、前述の界面活性剤アシルポリオキシエチレンソルビタンエステル及び酵素を含む第1試薬と、界面活性剤アルキルポリオキシエチレンエーテルを含む第2試薬とからなる。

【0023】第1試薬中の酵素には、例えばCE、COなどを挙げるができる。また第1試薬中には、酵素の他に、通常例えば、酵素POD、さらにHDAOS、TOOSなどの色原体が配合され得るが、これらの色原体と反応してキノン色素を生成するもの、例えば4-アミノアンチピリンなどは配合されない。

【0024】これに対して、第2試薬中には、当該界面活性剤の他に、通常、色原体と反応してキノン色素を生成するもの、例えば4-アミノアンチピリンなどが配合される。

【0025】なお、本発明の試薬キットは、遅くともHDLコレステロールの定量測定時において、このように第1及び第2の二種類の試薬に分かれていれば良い。従って、一般に試薬キットとしての形態は、安定性などを考慮して三種類以上の試薬に分けておき、測定のため使用時において上記の第1及び第2の二種類の試薬に調製するようなものでも良い。

【0026】

【実施例】以下、本発明をより詳細に説明するため実施例を挙げるが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0027】【実施例1】界面活性剤アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルとして商品名がTween 85、また界面活性剤アルキルポリオキシエチレンエーテルとして商品名がBr i j 98の界面活性剤をそれぞれ使用して、次の第1及び第2試薬を準備した。

【0028】〈第1試薬〉10mMのリン酸緩衝液(pH7.0)、0.12mg/mlのHDAOS、0.6単位/mlのPOD、10単位/mlのCO、10単位/mlのCE、0.01w/v%のTween 85

【0029】〈第2試薬〉10mMのリン酸緩衝液(pH7.0)、0.15mg/mlの4-アミノアンチピリン、1.5w/v%のBr i j 98

【0030】日立7170型自動分析装置を用いて、試料4μlに第1試薬250μlを加え、5分後に第2試

(4)

6

薬50μlを加え、5分後に波長600nm/700nmで測定した。試料としてHDLコレステロール濃度が150mg/dlの血清を10段階に希釈したものを用いたところ、表1に示すように、良好な直線性が得られた。

【0031】

【表1】

希釈率	測定濃度 (mg/dl)
0	0
1/10	13.3
2/10	26.6
3/10	39.7
4/10	52.5
5/10	68.0
6/10	83.0
7/10	100.0
8/10	116.7
9/10	134.1
10/10	150

【0032】この実施例においては、第1試薬を添加した後に、遠心分離などの煩雑な操作を必要とせず、試料中に第2試薬を添加するだけで、試料中のHDLコレステロールの量に対応して生成されたキノン色素の比色測定が行なわれる。

【0033】【実施例2】実施例1と同様の試薬を用いて、同様に日立7170型自動分析装置で20例のヒト血清を試料として測定し、標準液の測定からHDLコレステロール値を求めた。そして同じ試料について市販製品【商品名：HDL-コレステロール(PG)、国際試薬社製】を用いて測定した値と比較した。その結果、表2に示すように、良好な相関性が得られた。

【0034】

【表2】

試料No	本発明の方法	従来の方法（市販製品）
1	57.3	55.8
2	55.6	58.6
3	28.5	21.0
4	75.4	74.4
5	55.1	50.8
6	69.0	65.5
7	67.0	61.5
8	37.3	33.2
9	43.8	40.1
10	77.8	78.4
11	65.6	56.7
12	83.5	82.0
13	54.4	52.1
14	49.4	47.5
15	57.9	55.5
16	48.3	44.0
17	56.1	55.1
18	52.9	49.7
19	60.3	52.9
20	127.4	124.5

単位：mg/dl

## 【0035】

【発明の効果】本発明のHDLコレステロールの定量方法によれば、従来、沈殿分画法において必要とされていた遠心分離の操作が不要となるので、操作が簡略化され、多数の試料を短時間で、かつ容易に処理できる。しかも2種類の試薬を用いる方法に応用できるので、汎用型の自動分析装置を用いた連続的な測定が可能となり、HDLコレステロールを他の検査項目とマルチチャンネル化して測定することができる。また、試料を取り扱う上で、試料に直接手を触れる機会が著しく減少するので、ウイルス感染の危険性も減少する。さらに、微量の試料に対しても測定可能であるので、小児や老人など採血量に制限がある場合でも測定が可能となる。従って、本発明方法は、臨床検査の分野において極めて有用であり、臨床検査の日常業務における作業効率の向上に貢献することができる。

【0036】また、本発明のHDLコレステロール定量用試薬キットは、本発明方法を実施するための試薬キットとしての効果を奏する。

フロントページの続き

(72)発明者 橋口 陽一  
神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内